

FORMALDEHYDBILDUNG
AUS DER N-DEMETHYLIERUNG
VON ARZNEIMITTELN AM CYTOCHROM P-450
UND OXIDATION ZU FORMIAT UND CO₂
IN DER INTAKTEN RATTE
UND ISOLIERT PERFUNDIERTEN LEBER

Christian Waydhas

1402



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität München
Direktor: Prof.Dr.Th.Bücher

FORMALDEHYDBILDUNG AUS DER N-DEMETHYLIERUNG VON
ARZNEIMITTELN AM CYTOCHROM P-450 UND OXIDATION ZU
FORMIAT UND CO₂ IN DER INTAKTEN RATTE UND ISOLIERT
PERFUNDIERTEN LEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Waydhas
aus
München
im Jahr
1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sies

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.10.1982



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

DANKSAGUNG

Danken möchte ich meinen lieben Eltern für die großzügige Unterstützung, die sie mir während des Studiums gewährt haben und die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Danken möchte ich Herrn Professor Sies, der mir ein verständiger und vorbildlicher Lehrer war und ist.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINFÜHRUNG	1
II. METHODEN	
1. Tiere und Futter	7
2. Leberperfusion	8
3. CO ₂ -Abatmungstest	9
4. Leberhomogenat	10
5. Enzym- und Substratmessungen	10
6. Messung des markierten ¹⁴ CO ₂	12
7. Chemikalien und Geräte	13
III. ERGEBNISSE	
1. Glutathion-Efflux während der Drogenoxidation	14
2. CO ₂ -Produktion aus Aminopyrin in der perfundierten Leber	16
3. CO ₂ -Produktion aus Aminopyrin in der intakten Ratte	18
4. Formaldehyd- und Formiat-Produktion aus Aminopyrin in der perfundierten Leber	21
5. Geschwindigkeit der Formiatoxidation	23
6. Die Rolle der peroxidatischen Reaktion der Katalase	26
7. Der Einfluß des NADH-Redoxpotentials	26
8. Metabolische Wirkungen auf die Aminopyrin-N-Demethylierung	29
9. Einfluß des Thyroxins auf den Aminopyrinabbau	31
IV. DISKUSSION	
1. Glutathionfreisetzung während der Drogenoxidation	33
2. Geschwindigkeitslimitierung der CO ₂ -Bildung durch die Formiatoxidation	34
3. Relative Bedeutung der Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase und der peroxidatischen Reaktion der Katalase	38
4. Formaldehydoxidation	39
5. Aminopyrinabbau und Schilddrüsenhormone	40
6. Konsequenzen für den "CO ₂ -Abatmungstest" in Mensch und Tier	40

V. ZUSAMMENFASSUNG

42

VI. REFERENZEN

44

VII. LEBENS LAUF

48

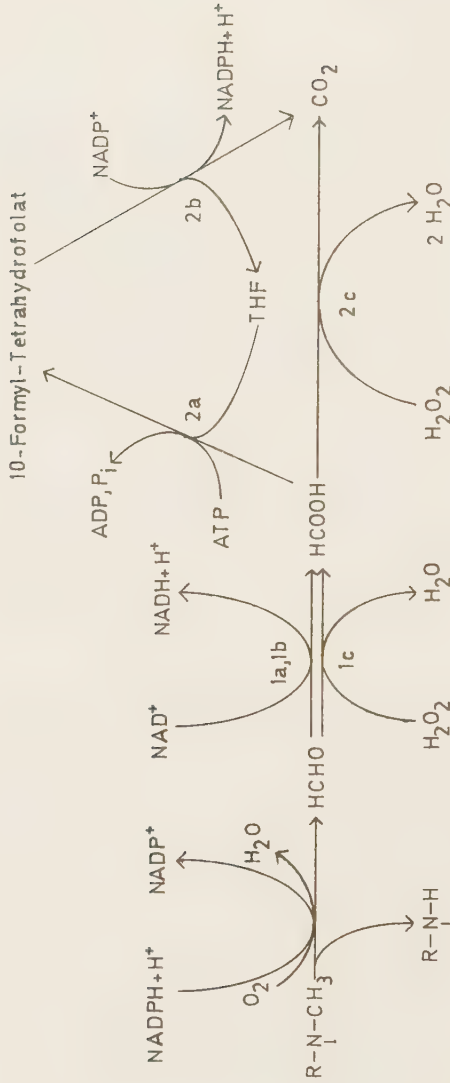
I. EINFÜHRUNG

Am Cytochrom P-450 des mischfunktionellen Monooxygenasesystems im endoplasmatischen Retikulum der Leber findet neben einer Vielzahl anderer Reaktionen (6) auch die oxidative N-Demethylierung statt. Diesem Reaktionsmechanismus, bei dem Formaldehyd gebildet wird (25), unterliegen neben unserem Modellsubstrat Aminopyrin (5) eine große Zahl anderer Substanzen, von denen nur einige der wichtigsten genannt seien (6,39,64): das Insektizid Bidrin, die Karzinogene Dimethylnitrosamin und Di- bzw. Monomethylaminoazobenzen, die Opiate Äthylmorphin und Acetylmethadon sowie Benzphetamin und Metamphetamin.

Diese Stoffe werden unter NADPH- und Sauerstoffverbrauch N-demethyliert. Dabei entsteht Formaldehyd (Schema 1). Das benötigte reduzierte NADPH wird durch die Isozitat-Dehydrogenase, das Malatenzym oder den Pentosephosphatweg in Abhängigkeit von der Ernährungslage zur Verfügung gestellt (62,49).

Eine Vorbehandlung mit Phenobarbital induziert die N-Demethylase-Aktivität bis zum 4- bis 5-fachen des Ausgangswerts (31).

Bei der Gabe von Aminopyrin zur perfundierten Leber phenobarbitalvorbehandelter Ratten tritt eine vermehrte Freisetzung von Glutathion auf (32), einem Tripeptid, das wesentlichen Anteil am Schutz der zellulären Strukturen vor Peroxiden hat. Gemessen wurde dabei nur das Gesamtglutathion (reduzierte (GSH) + oxidierte (GSSG) Form). Wir haben nun versucht zwischen GSH und GSSG zu differenzieren und die Eigenschaften des Glutathionausstroms näher zu charakterisieren. Von besonderem Interesse war, ob die Glutathionfreisetzung eine mögliche H_2O_2 -Produktion oder Bildung anderer Peroxide während der Aminopyrinoxidation widerspiegelt oder auf Änderungen im Redox-Zustand der Leberzellen zurückzuführen ist. In Schema 2 werden die verschiedenen Möglichkeiten noch einmal dargestellt.

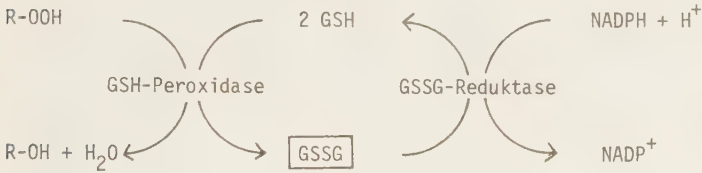


Schema 1

Vereinfachte Reaktionsfolge der Formaldehyd-, Formiat- und CO_2 -Produktion aus der Arzneimittel-N-Demethylierung am Cytochrom P-450. Die Reaktionen sind: 1a Formaldehyd-Dehydrogenase (GSH-abhängig), 1b Aldehyd-Dehydrogenase, 1c Katalase (peroxidatischer Reaktionsmodus), 2a Formyltetrahydrofolat-Synthetase, 2b Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase, 2c Katalase (peroxidatischer Reaktionsmodus).

Schema 2

Der Verbrauch und die Regenerierung von reduziertem Glutathion

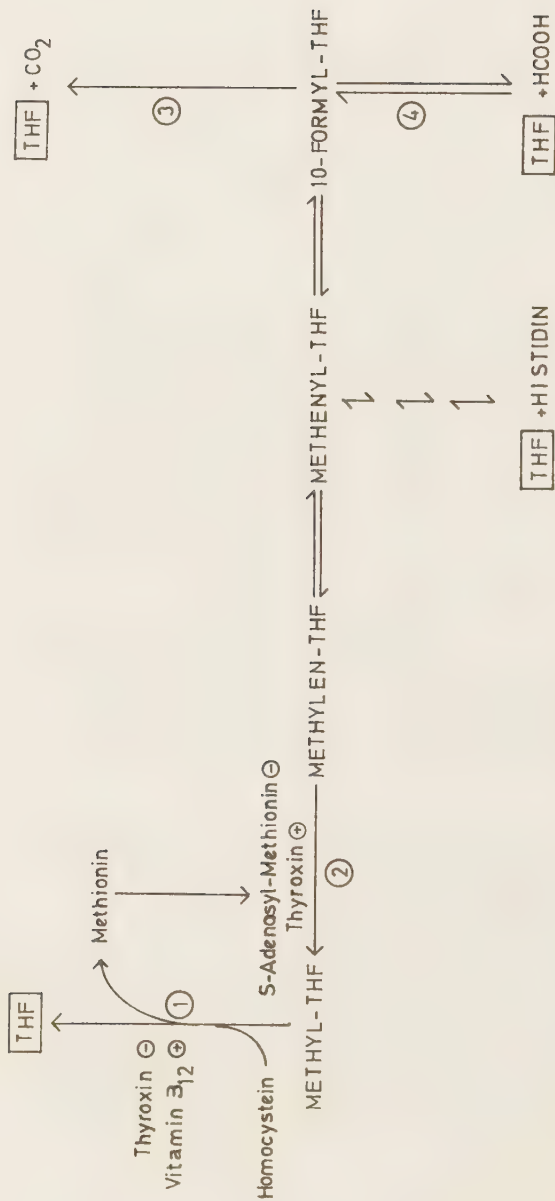


Das bei der N-Demethylierung und beim Methanolabbau (28,36) entstehende potentiell zytotoxische Formaldehyd wird über verschiedene Stoffwechselwege zu Formiat und Kohlendioxid oxidiert (55). Die Formaldehydfreisetzung ist ein weitverbreiteter Parameter in Untersuchungen des Cytochrom P-450 Systems in isolierten Mikrosomen, und die Produktion und Abatmung von CO₂ wird in vitro und in vivo als Maß für die Größe der N-Demethylierung verwendet. Trotzdem ist über das Schicksal des gebildeten Formaldehyds im intakten Organ und Tier relativ wenig bekannt.

Verschiedene Zellorganellen nehmen an der Oxidation zu CO₂ teil. Wie Schema 1 zeigt, wird der erste Schritt, die Formiatbildung, durch die zytosolische, GSH-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (54,58), die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase (11,12) und die peroxisomale Katalase in ihrem peroxidatischen Reaktionsmodus (10,41) katalysiert.

Für die Oxidation von Formiat zu CO₂ stehen zwei Wege zur Verfügung: der peroxidatische Reaktionsmodus der Katalase (1,10,33), geschwindigkeitslimitiert durch die Verfügbarkeit von H₂O₂ (33), und die gekoppelte Reaktion der 10-Formyltetrahydrofolat-Synthetase und 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase im Zytosol (21,23).

Dieser letzte Abbauschritt steht somit in enger Wechselwirkung mit dem Stoffwechsel der C₁-Einheiten im Folsäuremetabolismus und ist deshalb vom Zustand und von Veränderungen des Folsäurestoffwechsels abhängig (Schema 3). So mag die Metabolisierung von Formiat von Faktoren abhängen wie dem Angebot an freier Tetrahydrofolsäure (THF),



Schema 3

Vereinfachtes Schema des Tetrahydrofolatstoffwechsels. Die von unten kommenden Reaktionen verbrauchen freies Tetrahydrofolat, die nach oben gehenden Reaktionen setzen es frei. Die Enzyme sind: 1 Methionin-Synthetase, 2 5,10-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase (irreversibel(20)), 3 Formyl-tetrahydrofolat-Dehydrogenase (irreversibel(24)), 4 Formyl-tetrahydrofolat-Synthetase. + und - bezeichnen Stimulierung bzw. Hemmung der Enzymaktivität. THF = Tetrahydrofolat.

dem Bedarf an C_1 -Einheiten für Synthesereaktionen und den Aktivitäten der Enzyme des Folsäurestoffwechsels.

Untersuchungen über den Histidinabbau, welcher ebenfalls über den Folsäuremetabolismus läuft, haben gezeigt, daß Maßnahmen, die die freie THF vermindern (Folsäure-, Vitamin B_{12} - und Methioninmangel), zu einer Verlangsamung des Histidinabbaus führen (7,21,40). Diese Hemmung ist in allen drei Fällen durch Gabe von Methionin zu beheben.

Wir wollten mit dieser Arbeit klären, auf welchem Weg das vom Amino-
pyrin stammende Formaldehyd metabolisiert wird, und inwieweit Wechselwirkungen mit verschiedenen Zuständen des Folsäurestoffwechsels bestehen. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Befunde von Stokstad et al. (53), daß das Schilddrüsenhormon Thyroxin zu deutlichen Veränderungen im Metabolismus der Folsäure führt. Dabei bewirkt ein hyperthyreoter Zustand Veränderungen im Sinne eines Vitamin B_{12} -Mangels und der anderen oben genannten Mangelzustände (51,53).

KATALOG DER ENZYME

Name	E.C. Nummer
Aldehyd-Dehydrogenase	1.2.1.3.
Formaldehyd-Dehydrogenase	1.2.1.1.
Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase	1.5.1.6.
Formyltetrahydrofolat-Synthetase	6.3.4.3.
Katalase	1.11.1.6.
Methionin-Synthetase	
(= Homocystein-Methyltransferase)	2.1.1.13.
5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase	1.1.1.68.

II.METHODEN

1.Tiere und Futter

Für die Versuche wurden männliche Wistar Ratten (Fa.Thomae,Biberach) verwendet.Die Tiere hatten bei den Perfusionsexperimenten ein durchschnittliches Gewicht von 154 ± 5 g (SEM),bei den CO_2 -Abatmungsversuchen lagen sie zwischen 90 und 130 g.Die Selenmangel-Ratten wogen $243 \pm 7,5$ g.

Die Ratten erhielten Altromin Laboratoriumsdiät und Wasser ad libitum.Ein besonderes Futter bekamen jene Tiere,die zu den CO_2 -Abatmungsversuchen verwendet wurden,um sie in einen Zustand des Methioninmangels zu bringen.Dazu wurde das Sojabohneneiweiß als Proteinquelle gewählt,da es nur 0,2 % Methionin enthält.Die folgende Aufstellung gibt die vollständige Zusammensetzung des Futter wieder(7):

Sojabohnenprotein	200 g
Salzmischung (63)	35 g
Vitaminmischung	10 g
Vitamin B ₁₂	5 g
Cholinchlorid	1 g
Maisöl	40 g
Glukosemonohydrat	709 g
Gesamt	1000 g

Die 10 g Vitaminmischung enthalten: 2 mg Folsäure, 15 mg Thiamin, 15 mg Riboflavin, 15 mg Pyridoxin, 50 mg Kalziumpantothenat, 50 mg Niacin, 80 mg Inosit, 10 mg Menadion, 0,2 mg Biotin und Glukose ad 10 g.

In den 40 g Maisöl befinden sich 15.000 IU Vitamin A, 2.000 IU Vitamin D und 50 IU Vitamin E.

Aus den Ratten mit diesem Futter wurden 4 Gruppen gebildet,von denen 3 mit Phenobarbital vorbehandelt wurden.2 Gruppen,eine davon

ohne Phenobarbitalbehandlung, bekamen die unveränderte Diät.

Eine Gruppe erhielt zusätzlich 20 mg Thyroxin / kg Futter, um einen hyperthyreoten Zustand hervorzurufen.

Zur Erzeugung einer Hypothyreose wurde bei der 4. Gruppe pro kg Diät 1 g des Thyreostatikums Thiouracil zugesetzt.

Die Diät wurde 3-4 Wochen vor den Versuchen begonnen.

Das Futter der Selenmangel-Ratten setzte sich wie folgt zusammen(8,9):

Torulahefe (selenarm)	30 g	Salzmischung	3,5 g
Saccharose	58,8 g	Vitaminmischung	1,0 g
Maisöl	6,7 g	Vitamin E	100 IU

Bei einer Kontrollgruppe wurde Selen (Na_2SeO_3) mit 0,5 ppm substituiert. Die Diät wurde mindestens 4 Wochen lang ab einem Rattengewicht von 40 g gegeben.

Zur Phenobarbitalvorbehandlung wurde entweder dem Trinkwasser mindestens 7 Tage vor den Versuchen 1 g Natrium-Phenobarbital / 1l Wasser zugesetzt, oder für 3 Tage vor dem Experiment täglich 80 mg Natrium-Phenobarbital / kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

2. Leberperfusion

Die Leberperfusion wurde im offenen System nach Sies et al. (47) durchgeführt.

Dazu wurde die Ratte zuerst mit 60 mg Nembutal (=Pentobarbital) / kg Körpergewicht narkotisiert, sodann ihr Blut mit 1.000 IU Heparin ungerinnbar gemacht. Über eine Kanüle in der vena portae ("arterielle" Seite) wurde die Leber mit einem Krebs-Henseleit-Medium perfundiert:

Na^+	144 mM	Cl^-	126 mM
K^+	5,9 mM	HCO_3^-	25 mM
Mg^{++}	1,2 mM	H_2PO_4^-	1,2 mM
Ca^{++}	1,2 mM	SO_4^{--}	1,2 mM

Wenn nicht anders beschrieben, wurden dem Medium 2,1 mM L-Laktat und 0,3 mM Pyruvat in Form von Natriumsalzen zugegeben, und damit ein Laktat/Pyruvat-Quotient von 7 eingestellt. Die Begasung des Perfusats erfolgte mit einem O_2/CO_2 -Gemisch von 95/5 v/v. Die Temperatur des Perfusats betrug $37^\circ C$, der pH 7,4.

Der Durchfluß durch die Leber betrug $4,0 \pm 0,1 \text{ ml} \times (\text{g Leber-Feuchtwicht})^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Der Sauerstoff wurde an der vena hepatica kontinuierlich mit einer Clark-type Elektrode gemessen. Das O_2 -Angebot betrug $3,4 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Hiervon wurden bei Perfusion mit dem Krebs-Henseleit-Medium (Laktat und Pyruvat als einzige Substrate) nur etwa 2/3 verbraucht, so daß bei Zugabe sauerstoffkonsumierender Substanzen noch genug O_2 zur Verfügung stand, um anoxische Bedingungen zu vermeiden.

Das Perfusat verließ die Leber durch die vena hepatica ("venöse" Seite) und wurde dann gesammelt. Für die Radioaktivitätsmessungen wurde das Effluat kontinuierlich in 1-Minuten-Fractionen aufgefangen, während für die Substratteste Stichproben in 1-Minuten-Abständen entnommen wurden.

3. CO_2 -Abatmungstest

Die Versuche wurden in einem Dessikator, modifiziert nach (2,26), durchgeführt.

Die Ratten befanden sich in einem abgeschlossenen Käfig, in dem nur eine Öffnung zum Ansaugen frischer Luft und eine weitere zum Absaugen der gebrauchten, CO_2 -haltigen Luft vorhanden waren. Das Volumen des Käfigs betrug 1.600 ml, so daß bei dem verwendeten Luftstrom von 300 ml/min die Luft des Käfigs nach $3\frac{1}{2}$ Minuten zur Hälfte ausgetauscht war.

Die gebrauchte Luft wurde dann durch die Auswaschkammer gesogen, wo das Kohlendioxid absorbiert wurde. In der Kammer befanden sich 39 ml Auswaschflüssigkeit, welche aus Äthanolamin und Äthylenglykolmonoäthyläther im Mischungsverhältnis 1:2 bestand. Dabei wird über 99 % des abgeatmeten CO_2 absorbiert (26).

Die Ratten wurden unmittelbar nach intraperitonealer Injektion von Aminopyrin in den Dessikator gesetzt. Injiziert wurde ein konstantes Volumen von 5 ml/kg.

Unmarkiertes Aminopyrin wurde mit isotoner Kochsalzlösung zu einer 30 mM Stammlösung verdünnt. Dazu kam dann radioaktiv markiertes Aminopyrin, um eine spezifische Aktivität von 6 mCi/mol zu ergeben. Den Tieren wurde eine Dosis von 0,15 mMol/kg verabreicht.

Um den durch die Diät bedingten Methioninmangel kurzfristig kompensieren zu können, wurde bei den entsprechenden Versuchen 30 min vor Versuchsbeginn 1 mMol Methionin / kg i.p. gespritzt.

Da die Tiere oft an aufeinanderfolgenden Tagen zu Versuchen benutzt wurden, war es von Bedeutung, ob die eventuell vorhandene Restaktivität vom Vortag die neuen Messungen verfälschen würde. Kontrollmessungen nach 24 h haben jedoch gezeigt, daß nur noch 0,1 % der am Vortag gegebenen Dosis pro Stunde abgeatmet wird, und somit der neue Versuch nicht beeinträchtigt wird.

4. Leberhomogenat

Zur Messung der Aktivitäten der Glutathion-Peroxidasen wurde an Ende der Perfusion ein Leberhomogenat hergestellt (27,46). Dazu wurde 1 g Leber mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Hinzu kamen 1 mM EDTA und 1 % Triton X-100 zur Zerstörung der Membranen.

Nach der Homogenisierung wurde die Lebersuspension 30 min lang bei 105.000 g (= 40.000 Umdrehungen/min) zentrifugiert. Der Überstand kam für die Enzymteste zur Verwendung.

5. Enzym- und Substratmessungen

Glutathion-Peroxidase (27,46):

700 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

(mit 1 mM EDTA, 1 mM Glutathion, 1 mM Natriumazid,

0,25 mM NADPH, 1 U/ml Glutathion-Reduktase)

20-50 μ l Homogenat

Als Substrate wurden zur Differenzierung der selenabhängigen und selenunabhängigen Glutathion-Peroxidase

10 μ l 70 mM t-Butylperoxid und

10 μ l 35 mM H_2O_2 verwendet.

Wellenlänge: 366 nm, 37°C

Laktat-Dehydrogenase:

500 μ l 0,1 M TRA-Puffer pH 7,6

(mit 3,6 mM Pyruvat, 0,2 mM NADH, 2,4 mM EDTA)

1000 μ l Perfusat

Wellenlänge: 366 nm, 25°C

Glutathiondisulfid(GSSG)(47):

200 μ l 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

(mit 1 mM EDTA, 26 μ M NADPH)

500 μ l Perfusat

5 μ l Glutathion-Reduktase (12 U/ml)

Zwei-Wellenlängenverfahren mit 340-380 nm, 25°C

Auch für kleine Mengen von GSSG verläuft der Test linear (43).

Gesamtglutathion (GSH + 2 GSSG)(32,35,56):

1000 μ l 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 1 mM EDTA

100 μ l Perfusat

50 μ l 5,4 mM NADPH

10 μ l 2,5 mM 5,5-Dithiobis-(Nitrobenzoesäure)

10 μ l Glutathion-Reduktase (12 U/ml)

Wellenlänge: 405 nm, 25°C

Die Ergebnisse dieser Methode sind in sehr guter Übereinstimmung mit der Summe aus den voneinander unabhängigen Messungen von GSH und GSSG (43).

Formiat (16):

500 μ l 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 1 mM EDTA

100 μ l Perfusat(enteiweißt)

20 μ l 10 mM NAD^+

20 μ l Formiat-Dehydrogenase (40 U/ml)

Wellenlänge: 340 nm, 25°C

Formaldehyd (29):

1000 μ l Reaktionsgemisch (aus 1,95 M Ammoniumacetat, 79,5 mM Essigsäure, 19,4 mM Acetylaceton)

500 μ l Perfusat

Der Ansatz wird etwa 10-15 min bei 56°C inkubiert und dann bei

405 nm gegen einen Leerwert gemessen. Absorptionskoeffizient: 8000

6. Messung des $^{14}\text{CO}_2$

Zur Messung des aus ^{14}C -markierten Substraten entstandenen Kohlendioxids wurde das Perfusat in 1-Minuten-Fractionen in Erlenmeyerkolben gesammelt (14). Dem Perfusat wurden 4 ml 1 N HCl zugegeben, um das gelöste CO_2 auszutreiben. In einem mit 1 ml Phenyläthylamin gefüllten Zählbecher, welcher sich in dem Erlenmeyerkolben befand, wurde das Kohlendioxid absorbiert. Nach 24 h war alles CO_2 abgefangen. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit zum Phenyläthylamin wurde der Becher in die Zählkammer gegeben.

Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionsgeschwindigkeiten wurden auf der Grundlage der spezifischen Aktivitäten im arteriellen Perfusat errechnet. Zur Herstellung der Szintillationsflüssigkeit wurden 0,5 g Dimethyl-POPPOP und 10 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in 2 l Toluol und 1 l Methanol gelöst.

Zur Messung der CO_2 -Abatmung wurden 3 ml der Auswaschflüssigkeit in 10 ml einer leicht modifizierten Szintillationsflüssigkeit (17) gezählt.

7. Chemikalien und Geräte

(Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin, 12 Ci/mol (Radiochemical Centre, Amersham) wurde mit nicht markiertem Aminopyrin (Geschenk der Hoechst AG, Frankfurt) verdünnt und bei der Perfusion mit einer spezifischen Aktivität von 0,1 Ci/mol verwendet. Ähnliche spezifische Aktivitäten wurden mit ^{14}C -markiertem Formaldehyd und Formiat (beide von New England Nuclear, Boston) benutzt. Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme wurden von Merck (Darmstadt) und Boehringer (Mannheim) bezogen, mit Ausnahme von Natrium-Hexobarbital (Geschenk der Hoechst AG, Frankfurt).

Die Zwei-Wellenlängenmessungen wurden an einem Shimadzu Spektrophotometer (Modell UV 300), die anderen optischen Tests an einem Eppendorf Spektrophotometer (Modell 6114) ausgeführt. Bei der Radioaktivitätsmessung kam ein Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer zur Anwendung.

III. ERGEBNISSE

1. Glutathion-Efflux während der Drogenoxidation

Oshino und Chance (32) haben nach Gabe von Aminopyrin einen vermehrten Ausstrom von Glutathion aus der perfundierten Rattenleber gemessen. Bei unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß dieser Mehrausstrom ausschließlich auf die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) zurückzuführen ist. Die GSSG-Freisetzung stieg von $1,0 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf $5,8 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Der GSSG-Mehrausstrom wurde auch mit anderen Substraten des Cytochrom P-450 wie Äthylmorphin und Hexobarbital beobachtet (43). Bei der laktat- und pyruvatfreien Perfusion der Leber gehungerter Ratten war der Effekt noch deutlich größer ($8,3 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

Es ist bekannt, daß die Zufuhr von Hydroperoxiden zur perfundierten Leber eine Mehrfreisetzung an GSSG bewirkt (44,47), mit aller Wahrscheinlichkeit aufgrund einer Beschleunigung der GSH-Peroxidase-Reaktion. Umgekehrt ist es denkbar, daß die GSSG-Freisetzung bei anderen Stoffwechselvorgängen eine endogene Hydroperoxidproduktion widerspiegelt (32,47).

Um nun zu sehen, ob der GSSG-Ausstrom durch Aminopyrin auf eine endogene Bildung von H_2O_2 zurückzuführen ist, haben wir uns der Entdeckung von Lawrence und Burk (27) bedient, daß 2 verschiedene GSH-Peroxidasen, eine selenabhängige und eine selenunabhängige, mit verschiedener Substratspezifität existieren (9). Dabei verwendet die selenabhängige GSH-Peroxidase H_2O_2 und organische Peroxide gleichermaßen als Substrate, während das selenunabhängige Enzym mit H_2O_2 nur äußerst langsam reagiert.

Unsere Versuche haben gezeigt (Tabelle 1), daß der GSSG-Ausstrom bei Aminopyrinoxidation unabhängig vom Selenstatus gleich bleibt. Dagegen wurde bei zugegebenen H_2O_2 bei der Leber mit Selenmangel kein erhöhter GSSG-Efflux gefunden.

Um auszuschließen, daß das Wasserstoffperoxid aufgrund etwaiger Kompartimentierungsphänomene beim Tier mit Selenmangel nicht an das Aktivitätszentrum der GSH-Peroxidase gelangt, haben wir durch Infu-

Tabelle 1

Glutathiondisulfid(GSSG)-Freisetzung ($\text{nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) aus der Leber phenobarbitalvorbehandelter Ratten in verschiedenen Zuständen des Selenangebots. Substratfreie Perfusion, Ratten 24 h gehungert.
*nicht gehungert.

Zugabe	+ Selen	- Selen	Normaldiät
keine	1,1	1,2	1,3
Aminopyrin 0,7 mM	3,6	3,6	
H_2O_2 0,2 mM	5,7	1,1	5,8*
Benzylammoniumchlorid 1 mM	22,5	0,9	26

sion von Benzylammoniumchlorid, einem Substrat der Monoamino-Oxidase, eine endogene H_2O_2 -Bildung provoziert. Hier zeigte sich analog zur H_2O_2 -Infusion in der selensupplementierten Leber ein starker Ausstrom von $22,5 \text{ nMol GSSG} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ wogegen bei der Selenmangel-Leber kein Anstieg zu verzeichnen war.

Nach Beendigung der Versuche wurden zur Kontrolle die Aktivitäten der GSH-Peroxidasen im Leberhomogenat bestimmt. Die Aktivität im Extrakt der Lebern mit Selenmangel betrug mit H_2O_2 5 %, mit t-Butylperoxid 20 % der selensupplementierten Kontrolltiere. Die Werte liegen damit leicht unter früheren Ergebnissen (9,27,46).

Die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Perfusat, als Maß für die Intaktheit der Leber, schwankte zwischen $8,5$ und $19,8 \text{ mU} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ($\bar{x} = 13,9 \text{ mU} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

Um auszuschliessen, daß der GSSG-Ausstrom durch die Metabolisierung von Formaldehyd, dem Folgeprodukt der N-Demethylierung, verursacht wird, haben wir die Glutathion-Freisetzung bei der Infusion von Formaldehyd studiert. Bei einer Infusionsgeschwindigkeit von $1 \text{ } \mu\text{Mol Formaldehyd} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, welche zu einer ähnlichen CO_2 -Produktion wie die Gabe von Aminopyrin führt, blieb der GSSG-Efflux unverändert.

Da unsere Ergebnisse gegen eine direkte Beteiligung von freiem H_2O_2 am GSSG-Mehrausstrom bei der Aminopyrinoxidation sprechen, haben wir

versucht, Daten zu finden, welche die Hypothese stützen, daß der GSSG-Ausstrom Ausdruck einer NADPH-Oxidation sei (32).

Zur Manipulation des NADPH/NADP⁺-Quotienten verwendeten wir Ammoniumchlorid, welches als starker Oxidant des mitochondrialen NADPH bekannt ist (42,45), für dessen zytosolische Wirkungen jedoch widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (42,57). Die Infusion von 2 mM Ammoniumchlorid zur substratfrei perfundierten Leber von selensupplementierten gehungerten Tieren führte jedoch zu keiner Steigerung des GSSG-Ausstroms.

Phenazinmethosulfat, ein unspezifischerer Oxidant, der zu einer Stimulation des Pentosephosphatwegs durch Oxidation von NADPH führt (19), zeigte einen GSSG-Ausstrom von $15 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ sowohl in selenarmen als auch in selensupplementierten Ratten.

2. CO₂-Produktion aus Aminopyrin in der perfundierten Leber

Um die CO₂-Produktion aus der N-Demethylierung von Aminopyrin näher zu charakterisieren, haben wir uns des Systems der perfundierten Leber bedient, welches als offenes System eine Beobachtung des zeitlichen Verlaufs gestattet. Bei Verwendung des Krebs-Henseleit-Mediums mit Laktat und Pyruvat als Substrate fanden wir eine CO₂-Produktion von $0,1 \text{ } \mu\text{Mol} \times (\text{g Leber-Feuchtgewicht})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei 0,8 mM Aminopyrin und Phenobarbitalvorbehandlung.

Die Zugabe von Methionin führte zu einem deutlichen Anstieg der CO₂-Bildung auf $0,28 \text{ } \mu\text{Mol} \times (\text{g Leber-Feuchtgewicht})^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Diese verdreifachte CO₂-Produktion war nach Absetzen des Methionins reversibel und kehrte zum Ausgangsniveau zurück (Abb.1). Bei Minute 80 wurde hier die Aminopyrininfusion beendet. Der Methionineffekt fand sich auch bei Ratten, die nicht mit Phenobarbital vorbehandelt waren. Entsprechend der niedrigeren N-Demethylierungsgeschwindigkeit waren die Werte ohne und mit Methionin $0,05$ bzw $0,12 \text{ } \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Interessanterweise ist die CO₂-Produktion der Leber gehungerter

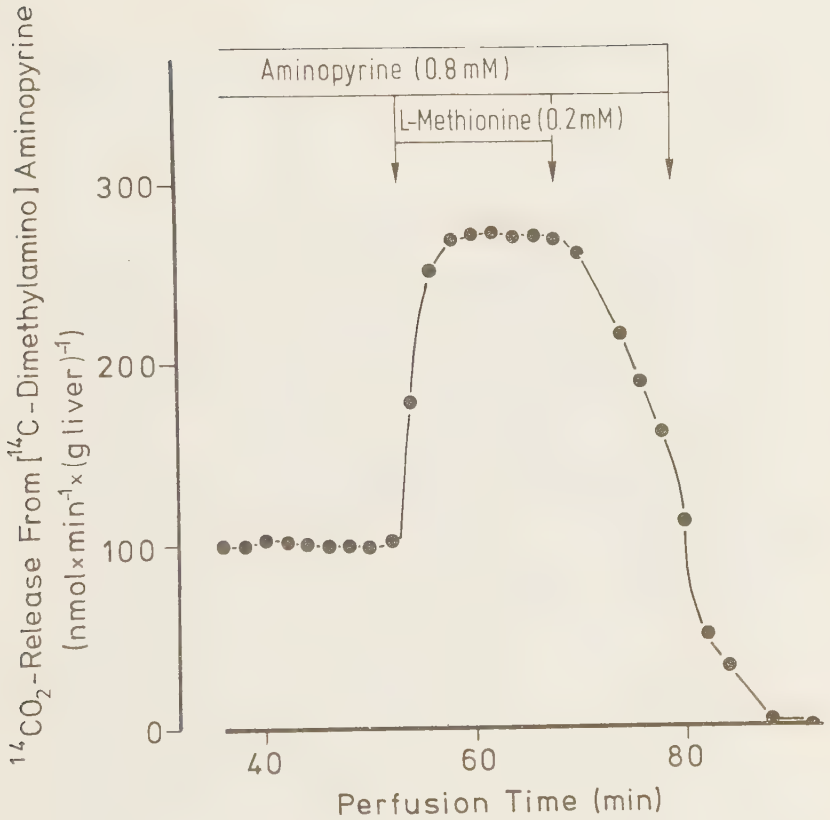


Abb.1

Reversible Zunahme der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin durch L-Methionin in der perfundierten Leber phenobarbitalbehandelter Ratten. Aminopyrin wurde während der gezeigten Perfusionsperiode mit einer Konzentration von 1 mM infundiert.

Ratten(Perfusionsmedium ohne Laktat und Pyruvat) schon ohne Methionin bei $0,2 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und läßt sich durch Zugabe der Aminosäure nicht mehr wesentlich steigern.

3.CO₂-Produktion aus Aminopyrin in der intakten Ratte

Da die CO₂-Abatmung ein vielverwendeter Parameter zur Bestimmung der Aminopyrinoxidation im lebenden Organismus ist, haben wir uns interessiert, ob ein Methionineffekt auch in vivo vorhanden ist.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der ¹⁴CO₂-Bildung aus (Dimethylamino-¹⁴C)Aminopyrin in phenobarbitalvorbehandelten Ratten mit Laboratoriumsdiät (Gruppe 1) und methioninarmer Diät (Gruppe 2). In Gruppe 1 waren nach 3 h 50 % der Aminopyrindosis als CO₂ abgeatmet (in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren) (2,26). Die ¹⁴CO₂-Produktion der Tiere, die auf einer Diät mit niedrigem Methionin gehalten wurden, war demgegenüber um 25 % erniedrigt. Die Injektion von Methionin (1 mMol/kg Körpergewicht) 30 min vor Beginn des Experiments führte in den Tieren mit methioninarmer Diät zu einem deutlichen Anstieg um 60 %. Die Methionininjektion in den Ratten mit Laboratoriumsdiät hatte nur eine vergleichsweise geringe Stimulation von 15 % zur Folge. Unabhängig von der diätetischen Methioninzufuhr betrug das abgeatmete CO₂ nach Methionininjektion 55 % der zugeführten Aminopyrindosis.

Einen genaueren Einblick gibt die zeitliche Analyse der Methioninwirkung (Abb.2). Dabei zeigt sich bei den Tieren der Gruppe 2, daß die erhöhte CO₂-Abatmung nach Methionininjektion fast ausschließlich auf eine vermehrte Freisetzung in der ersten Stunde beruht. Ohne Methionin bleibt die Abatmung in der ersten Stunde auf einem Plateau, um erst dann langsam abzufallen.

Die Kinetik bei den Tieren auf Laboratoriumsdiät entspricht unabhängig von Methionininjektionen derjenigen der Tiere mit methioninarmen Futter und Methionininjektion.

Ratten mit einer methioninarmen Diät, aber ohne Phenobarbitalvorbehandlung, zeigten keine Methioninabhängigkeit. Ihre CO₂-Abatmung betrug 54 % und 52 % ohne bzw. mit Methionininjektion.

Tabelle 2

$^{14}\text{CO}_2$ aus (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben, die Abatmung von $^{14}\text{CO}_2$ steht in Klammern. Zur Vorbehandlung der Ratten siehe Methoden. Methionin (1 mMol/kg Körpergewicht) wurde 30 min vor Versuchsbeginn injiziert. Mit der Aminopyrininjektion (0,15 mMol/kg Körpergewicht) wurde das Experiment gestartet. Alle Tiere waren mit Phenobarbital vorbehandelt.

Gruppe	Diät	¹⁴ CO ₂ -Abatmung(% der Dosis an Aminopyrin)				% Änderung durch Methionin nach 1 h		
		nach 0,5 h	nach 1 h	nach 3 h				
		L-Methionin - +	L-Methionin - +	L-Methionin - +	L-Methionin - +			
1	Laboratoriumsdiät	22,0(3) ±0,6	24,4(3) ±2,1	32,9(3) ±0,8	37,9(3) ±2,1	49,3(6) ±2,5	55,7(3) ±1,2	15
2	Methioninarms	12,4(4) ±0,7	26,2(4) ±5,8	25,5(4) ±1,2	40,9(3) ±5,3	39,9(7) ±1,3	55,0(3) ±3,3	60
3	Methioninarms + L-Thyroxin	12,3(3) ±1,5	21,0(3) ±6,4	24,0(3) ±0,7	38,6(3) ±7,0	33,7(6) ±2,8	53,2(3) ±3,5	62
4	Methioninarms + Thiouracil	15,4(4) ±2,7	28,6(4) ±0,5	30,5(4) ±2,1	42,2(4) ±0,9	45,6(6) ±2,2	53,7(4) ±1,5	39

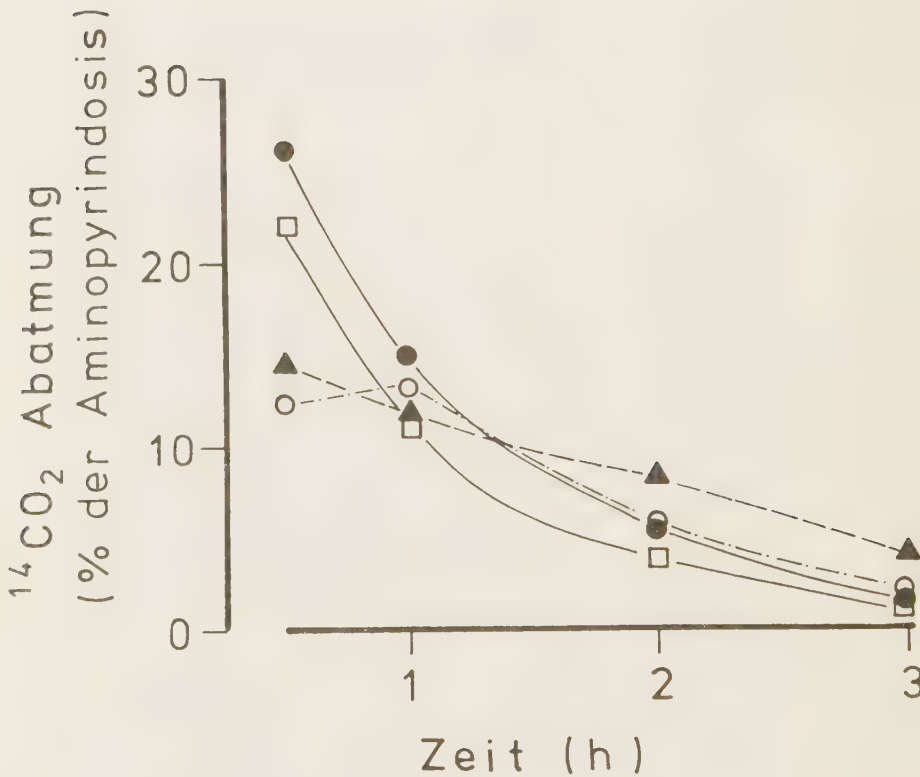


Abb. 2

Der zeitliche Verlauf der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung mit (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrין in Abhängigkeit von Methioninstatus und Phenobarbitalvorbehandlung. Aminopyrין wurde mit $0,15 \text{ mMol} \times (\text{kg Körpergewicht})^{-1}$, Methionin mit $1 \text{ mMol} \times (\text{kg Körpergewicht})^{-1}$ injiziert.

	Phenobarbital	Diät	Methionininjektion
●	+	methioninarm	+
○	+	methioninarm	-
▲	-	methioninarm	+
□	+	Laboratoriumsdiät	-

4. Formaldehyd- und Formiat-Produktion aus Aminopyrin in der perfundierten Leber

Aufgrund der Befunde an der perfundierten Leber wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen die auftretenden C_1 -Einheiten Formaldehyd, Formiat und CO_2 gleichzeitig gemessen wurden. Bei der Perfusion mit methioninfreiem Medium ergaben sich Produktionsgeschwindigkeiten von $0,1 \mu\text{Mol} \times g^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für CO_2 , $0,28 \mu\text{Mol} \times g^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Formiat und $0,02 \mu\text{Mol} \times g^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für Formaldehyd. Die Zufuhr von Methionin führte zu dem Anstieg von CO_2 und zu einem entsprechenden Abfall des Formiats im Perfusat (Abb. 3). Die Konzentration von Formaldehyd blieb konstant. Die Summe der C_1 -Einheiten, welche von der Leber freigesetzt wurden - etwa $0,4 \mu\text{Mol} \times g^{-1} \times \text{min}^{-1}$ - blieb von der Methioningabe unbeeinflusst. Der Effekt von 3-Hydroxybutyrat wird später diskutiert.

Tabelle 3

Formiatfreisetzung aus der perfundierten Leber phenobarbitalvorbehandelter Ratten. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte aus einer 15-minütigen Periode nach Zugabe der Substanzen. Es wurde kein Methionin gegeben. Die Angaben sind Mittelwerte $\pm$ SEM. (n = 4)

Zugabe	Formiatfreisetzung ($\mu\text{Mol} \times g^{-1} \times \text{min}^{-1}$)
keine	$0,01 \pm 0,003$
Aminopyrin 1 mM	$0,23 \pm 0,03$
Äthylmorphin 0,4 mM	$0,23 \pm 0,05$
Hexobarbital 0,4 mM	$0,01 \pm 0,003$

Eine Formiatfreisetzung wurde auch bei der Infusion von Äthylmorphin, einer Substanz die ebenfalls N-demethyliert wird, beobachtet, nicht jedoch bei Hexobarbital, welches eher hydroxiliert als N-demethyliert wird (Tabelle 3).

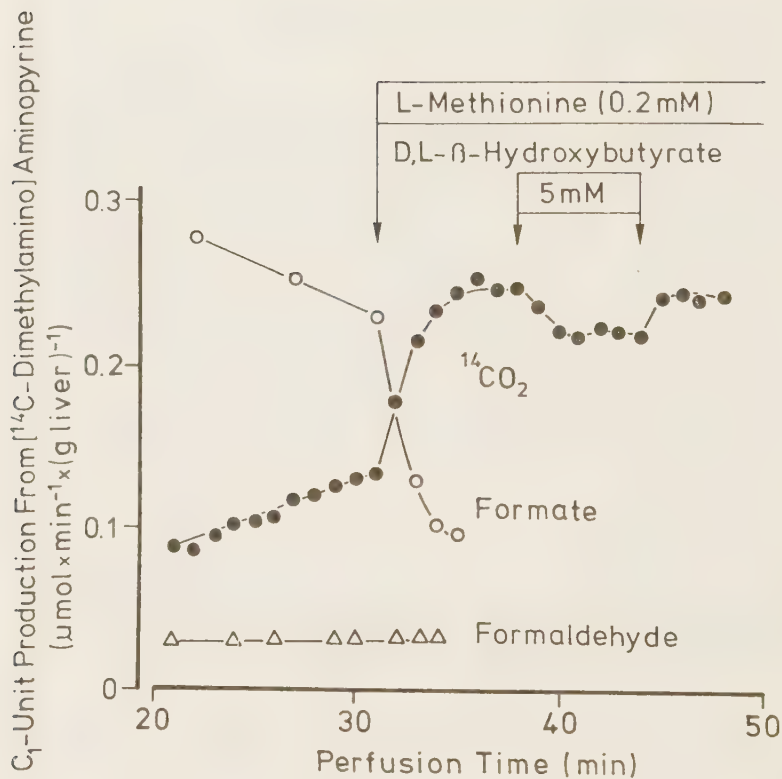


Abb.3

Produktion von C₁-Einheiten aus (Dimethylamino-¹⁴C)Aminopyrin und Wirkung von L-Methionin in der perfundierten Leber phenobarbitalbehandelter Ratten. Aminopyrin wurde während der gezeigten Perfusionsperiode mit einer Konzentration von 1 mM infundiert. Vor der Aminopyringabe war die Formaldehydfreisetzung Null. Methionin ändert nicht die Summe der freigesetzten C₁-Einheiten

In der ganzen Reaktionskette wird durch Phenobarbitalvorbehandlung nur die N-Demethylierung beeinflußt. Bei der Infusion von Formaldehyd oder Formiat zeigen sich bezüglich der CO_2 -Bildung keine Unterschiede zwischen vorbehandelten und unbehandelten Tieren.

5. Geschwindigkeit der Formiatoxidation

Die Tatsache, daß durch Methionin nicht die N-Demethylierung von Aminopyrin geändert wird sondern nur die Ausbeute an CO_2 , legt die Vermutung nahe, daß für die CO_2 -Produktion die Formaldehyd- oder Formiatoxidation geschwindigkeitsbestimmend ist und nicht die N-Demethylierung.

Eine Limitierung durch den Formaldehydabbau ist höchst unwahrscheinlich, wie schon die niedrige und methioninunabhängige Formaldehydausscheidung zeigt. Außerdem hat die Leber eine große Kapazität infundiertes Formaldehyd zu metabolisieren. Wie in Abb. 4 zu sehen ist, verläuft die Extraktion von Formaldehyd aus dem Perfusat proportional zur zugeführten Formaldehydkonzentration. Dabei ist das Verschwinden von Formaldehyd bis zu einer Ausgangskonzentration von über 0,25 mM vollständig durch die Summe aus gebildetem Formiat und CO_2 erklärbar.

Die Geschwindigkeit der Formaldehydoxidation liegt mit maximal $1,2 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ deutlich über der N-Demethylierungsgeschwindigkeit ($0,37 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (61)).

Von dem oxidierten Formaldehyd werden jedoch nur 5 % zu CO_2 abgebaut, während sich 95 % als Formiat anstauen. Nach der Gabe von Methionin verschieben sich die Ausbeuten auf 20 % CO_2 und 80 % Formiat.

In einem Experiment (ähnlich dem von Abb. 1) konnte die Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus ^{14}C -Formiat in Abhängigkeit vom Methioninangebot demonstriert werden (Abb. 5). Die maximale CO_2 -Freisetzung aus Formiat ist innerhalb von 6 min nach Beginn der Methionininfusion erreicht, und schon niedrige Konzentrationen von 0,1 mM Methionin sind für den maximalen Effekt ausreichend.

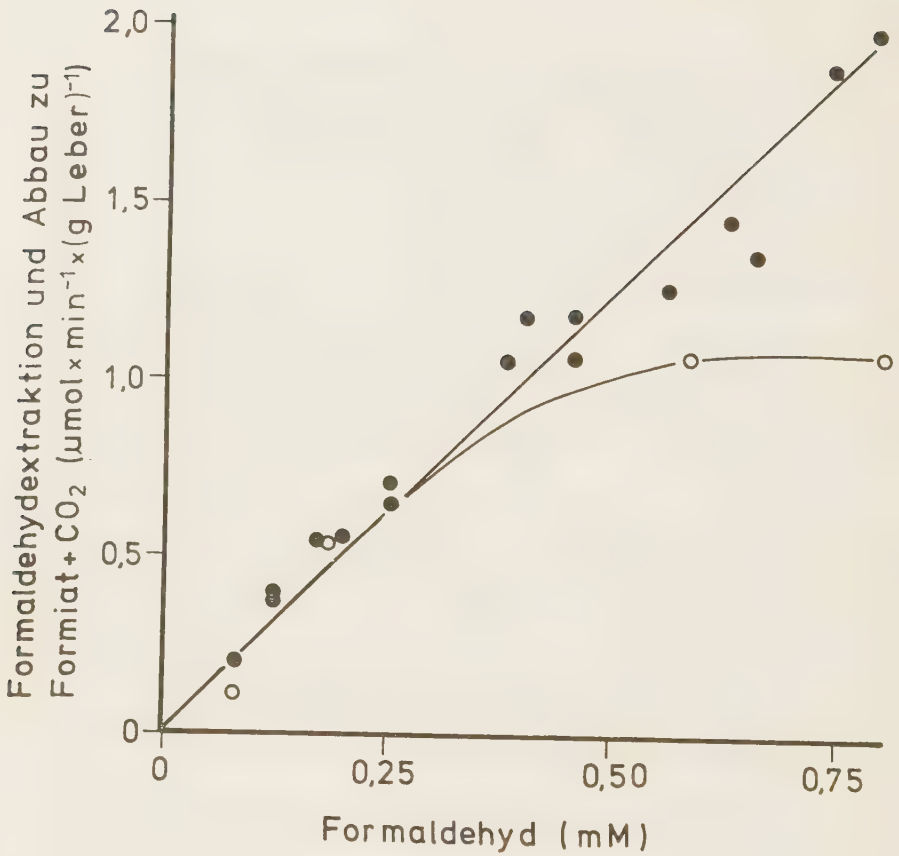


Abb.4

Extraktion von infundiertem Formaldehyd aus dem Perfusat und Anteil des zu Formiat und CO₂ oxidierten Formaldehyds.

● extrahiertes Formaldehyd

○ als Formiat und CO₂ wiedergefundenes Formaldehyd

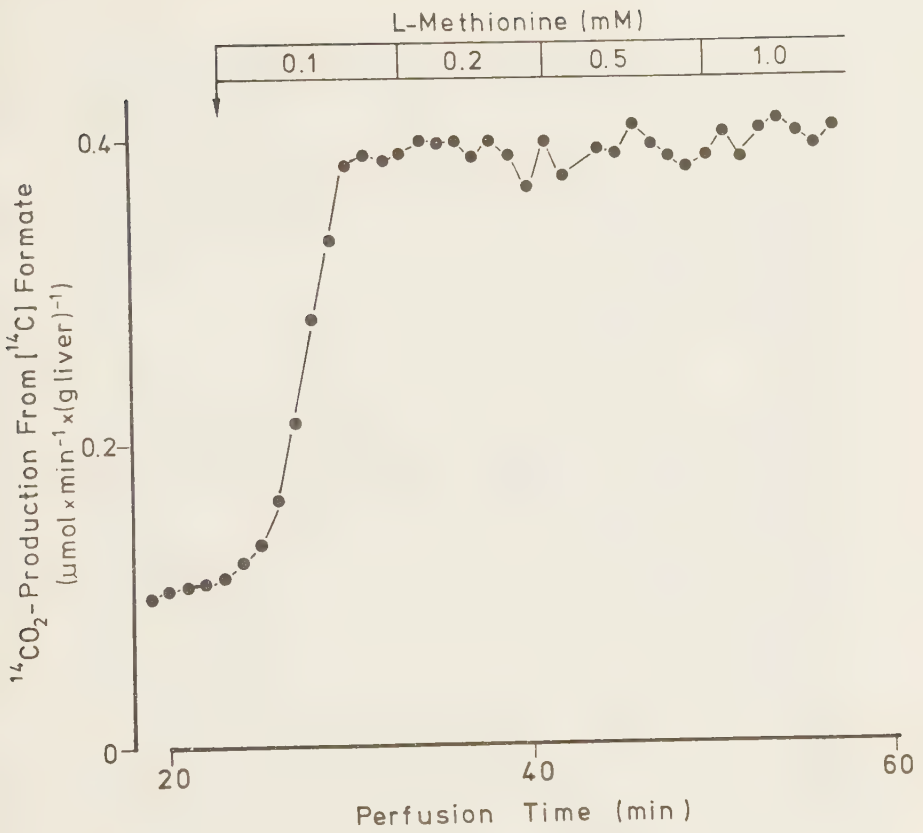


Abb.5

Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus ^{14}C -Formiat und Einfluß von Methionin in der perfundierten Leber. Formiat wurde in einer Konzentration von 2 mM zugegeben

Ein Vergleich der maximalen CO_2 -Produktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Substrat (Aminopyrin, Formaldehyd oder Formiat) zeigt eine Sättigung bei $0,1 \mu\text{Mol CO}_2 \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, unabhängig von der Art des Substrates (Abb.6). Die Zugabe von Methionin vervierfacht die CO_2 -Bildung. Das legt nahe, daß die Umwandlung von Aminopyrin zu CO_2 durch den letzten Schritt, die Formiatoxidation, limitiert wird und hierbei durch das Angebot an Methionin.

6. Die Rolle der peroxidatischen Reaktion der Katalase

In Leberstückchen (1,37) und in der perfundierten Leber (33,41) wurde gezeigt, daß Formaldehyd und Formiat aktive Wasserstoffdonatoren zum peroxidatischen Abbau des Katalase- H_2O_2 -Komplexes (Compound I) sind. Deshalb ist es denkbar, daß ein Teil der CO_2 -Produktion aus Aminopyrin von der peroxidatischen Reaktion der Katalase beigesteuert wird. Dieser Anteil ist jedoch schätzungsweise relativ klein, da die H_2O_2 -Produktion nur etwa $50 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ beträgt (33), und die Effektivität der peroxidatischen Reaktion in Gegenwart niedriger Wasserstoffdonator-Konzentrationen gering ist (34). Die Infusion von Natriumglykolat führt zu einem Anstieg der H_2O_2 -Produktion auf $490 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (33). Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus markiertem Aminopyrin wurde in Gegenwart von 2 mM Glykolat von 60 auf $70 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ gesteigert. Der Glykolateffekt ist etwas höher, wenn ^{14}C -Formiat oder ^{14}C -Formaldehyd als Wasserstoffdonatoren verwendet werden. Die CO_2 -Produktion erhöhte sich von 0,06 auf $0,12 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Der Effekt ist auf den Methionineffekt additiv (Abb.7).

7. Einfluß des NADH-Redoxpotentials

Die mitochondriale Oxidation von Formaldehyd durch die Aldehyd-Dehydrogenase, eine Reaktion, die Schenkman und Mitarbeiter in ihren Studien mit Mischungen von Mikrosomen und Mitochondrien betont haben (11,12), wird durch den Redox-Zustand des mitochondrialen NADH be-

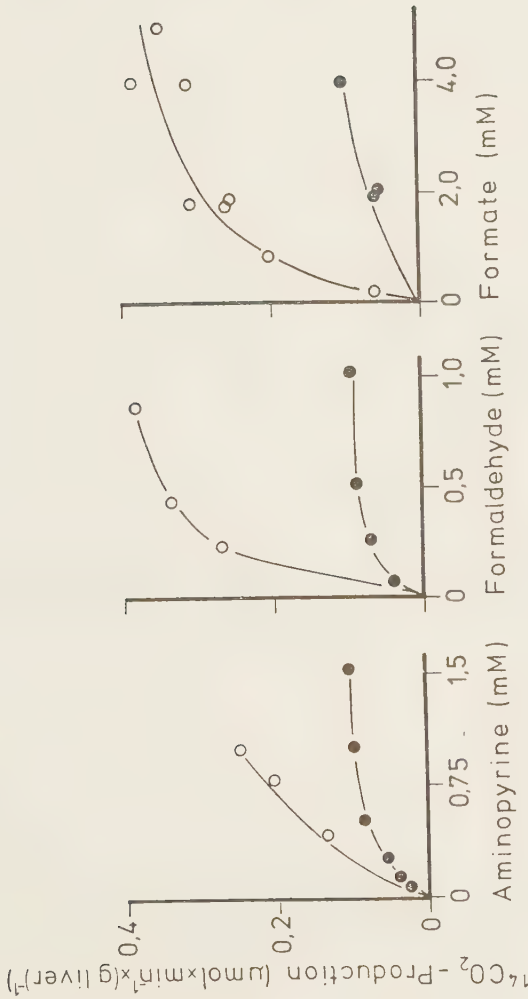


Abb. 6
 Konzentrationsabhängigkeit der $^{14}\text{C-CO}_2$ -Produktion aus (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin, ^{14}C -Formaldehyd und ^{14}C -Formiat mit und ohne Methionin in der perfundierten Leber.
 ● ohne Methionin, ○ mit Methionin

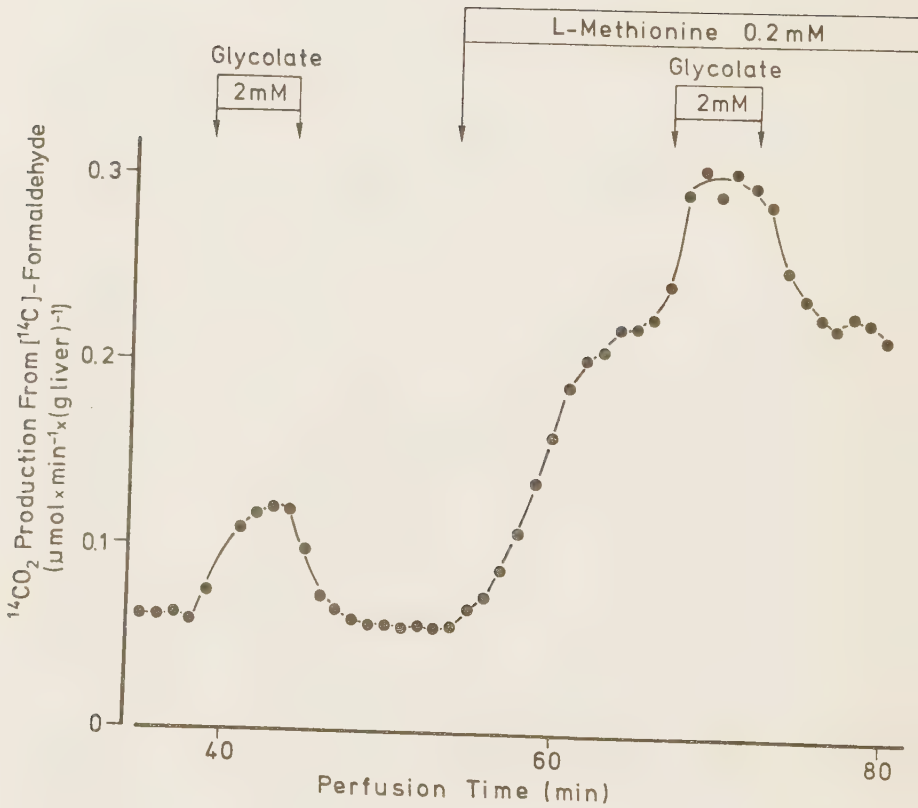


Abb.7

Die reversible Zunahme der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus ^{14}C -Formaldehyd (0,6 mM) durch Natriumglykolat in der perfundierten Leber

einflußt. Wie in Abb. 8 gezeigt, wird die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus ^{14}C -Formaldehyd durch Zugabe von Acetoacetat leicht stimuliert und durch 3-Hydroxybutyrat vermindert. Ähnliche Wirkungen kann man auch bei (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin beobachten (Abb. 2).

Umgekehrt können diese Beobachtungen erklären, daß nach Zugabe von Aminopyrin zur perfundierten Leber der 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat-Quotient ansteigt (61). Nach der Gabe von Aminopyrin ist kein signifikanter Anstieg im Reduktionszustand der mitochondrialen Cytochrome festzustellen (61), so daß eine Limitierung durch Anoxie als Ursache für diesen Anstieg des mitochondrialen Redoxindikator-Paars unwahrscheinlich ist.

Eine Abhängigkeit der CO_2 -Produktion aus Aminopyrin oder Formaldehyd (nicht aber Formiat) vom zytosolischen NADH-Redoxpotential wurde in Experimenten ähnlich dem von Abb. 8 gezeigt. Wenn der Laktat/Pyruvat-Quotient im arteriellen Perfusat von normal 2,1 mM/0,3 mM auf 7,1 mM/0,3 mM, d.h. auf einen Wert von 24 erhöht wurde, ergab sich eine Erniedrigung der CO_2 -Produktion um 20 %. Auch die Zufuhr von 10 mM Äthanol, was zu einem Anstieg des Laktat/Pyruvat-Quotienten auf 24 führt, hatte eine ähnliche Senkung der CO_2 -Bildung zur Folge.

Xylit (5 mM), ein weiterer zytosolischer Reduktant, verursachte einen 10 %igen Abfall. Somit kann auch die zytosolische NAD-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase in ihrer Oxidationsrate von Änderungen des NADH-Redoxpotentials beeinflußt werden.

8. Metabolische Wirkungen auf die Aminopyrin-N-Demethylierung

Metabolische Effekte auf den Drogenstoffwechsel oder auf die Formaldehyd-Formiat- CO_2 -Umwandlung sind in der perfundierten Leber leicht zu messen. Die oben erwähnte Senkung der CO_2 -Produktion aus Aminopyrin nach Äthanolgabe ist von einer Akkumulierung von Formaldehyd begleitet, wie der vorübergehende Anstieg der Formaldehydfreisetzung von $22 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf $40 \text{ nMol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ zeigt. Ein anderes Beispiel ist der Effekt von Aminoxyacetat (0,5 mM), der ebenfalls

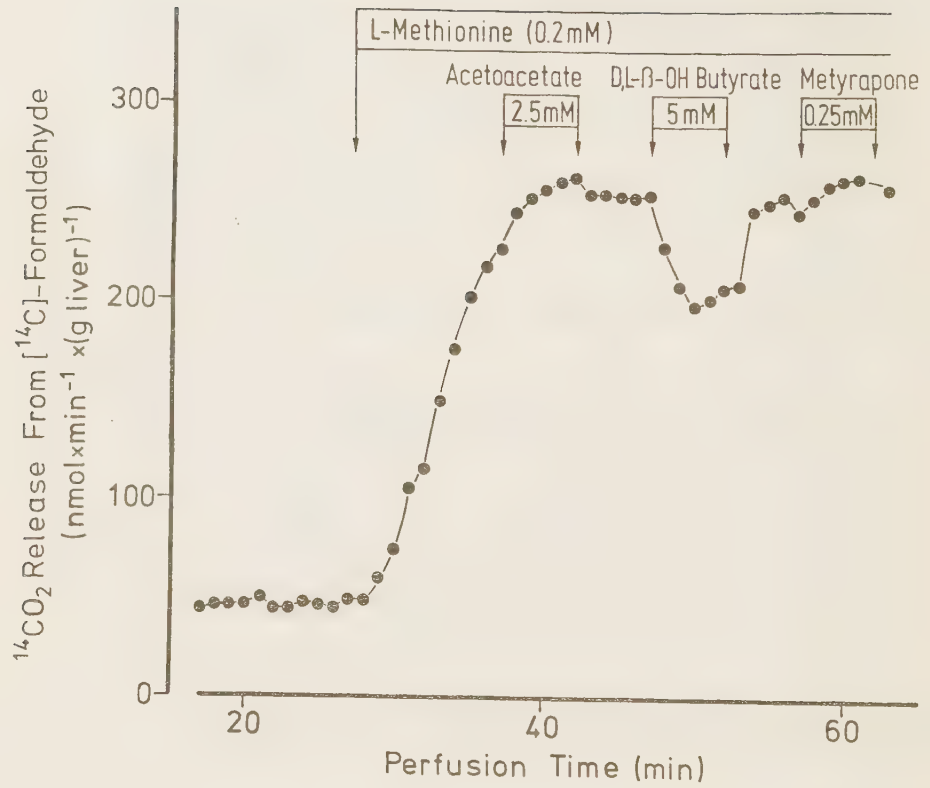


Abb.8

Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus ^{14}C -Formaldehyd (0,8 mM) bei Änderung des mitochondrialen Redoxzustandes in der perfundierten Leber phenobarbital-behandelter Ratten

zu einem Abfall der CO_2 -Produktion auf 70 % führt, wenn es zur substratfrei perfundierten Leber gehungelter (aber nicht gefütterter) Ratten gegeben wird. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der früheren Beobachtung einer Hemmung der N-Demethylierung durch Aminoxyacetat in isolierten Hepatozyten (62). Die Erklärung für diese Inhibierung ist von der des Äthanol-effekts verschieden. Im gehungelten Zustand hängt das Monooxygenase-System von der mitochondrialen Bereitstellung von NADPH-Reduktionsäquivalenten ab, und Aminotransferasen, welche durch Aminoxyacetat gehemmt werden, scheinen an deren Transport beteiligt zu sein (62).

Metopiron (0,25 mM), ein Inhibitor der Drogenoxidation, führt zu einer Abnahme der CO_2 -Produktion aus Aminopyrin um 60 %, wogegen die CO_2 -Produktion aus Formaldehyd unbeeinflusst bleibt (Abb.8).

Die Infusion von Antimycin A (18 μM) führt zu einer Anhäufung von Formiat und einem Abfall der CO_2 -Entstehung, wahrscheinlich aufgrund einer Verlangsamung der Reaktion der Formyltetrahydrofolat-Synthetase durch ATP-Mangel.

9. Einfluß des Thyroxins auf den Aminopyrinabbau

Da die Schilddrüsenhormone den Histidinabbau über Wirkungen auf den Folsäuremetabolismus beeinflussen (53), war es von Interesse, ob endokrine Faktoren wie Hyper- oder Hypothyreose auch den Aminopyrinstoffwechsel verändern.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2. Thyroxinüberschuß führte, verglichen mit Tieren ohne zusätzlichem Schilddrüsenhormon (Gruppe 2), zu keinen Veränderungen in der CO_2 -Exhalation aus Aminopyrin. Eine vorherige Methionininjektion steigerte die CO_2 -Abatmung analog zu Gruppe 2 um 62 %. Die Tiere mit thyreostatischer Behandlung (Thiouracil) zeigten jedoch eine 20 % höhere CO_2 -Abatmung als die Ratten aus Gruppe 2. Durch die Methionininjektion ließ sich nur mehr eine 39 %ige Beschleunigung der Kohlendioxidproduktion erzielen.

Die anschließende Perfusion der Lebern zeigte bei den hyperthyreoten

Tieren eine sehr niedrige CO_2 -Produktion von $0,01 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, die durch Methionin nicht stimulierbar war. Überraschenderweise war nach Verminderung der infundierten Aminopyrinskonzentration von 1 mM auf 0,4 mM ein Methionineffekt auslösbar. Auch bei der Perfusion der Leber thiouracilbehandelter Ratten war die CO_2 -Produktion, trotz normaler N-Demethylierung von $0,4 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, mit $25 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und $50 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ohne bzw. mit Methionin erstaunlich niedrig.

IV. DISKUSSION

1. Glutathionfreisetzung während der Drogenoxidation

Ein Mehrausstrom von GSSG, ausgelöst durch den Vorgang der Drogenoxidation, wurde mit drei Substraten (Aminopyrin, Äthylmorphin und Hexobarbital) beobachtet. Die Art dieses GSSG-Ausstroms kann noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine Beteiligung von H_2O_2 scheint nach unseren Ergebnissen unwahrscheinlich, da die aminopyrinabhängige GSSG-Freisetzung auch in Lebern von Selenmangel-Ratten zu beobachten war (Tabelle 1), wogegen die Infusion von H_2O_2 und die endogene Produktion von Wasserstoffperoxid nicht in der Lage waren, in diesen Lebern einen Mehrausstrom von GSSG hervorzurufen. Auch die Ergebnisse von Oshino und Chance (32) sprechen gegen eine H_2O_2 -Produktion bei der Drogenoxidation, denn sie fanden nach einer Hemmung der Katalase mit Aminotriazol keine Steigerung der GSSG-Freisetzung. Zu widersprechenden Ergebnissen kamen Orrenius et al. (18). Nachdem sie die Leberzellen mit Diäthylmaleat an Glutathion verarmt hatten, fanden sie bei der Drogenoxidation einen Anstieg des Katalase-Compound I, was für eine vermehrte H_2O_2 -Bildung spräche.

Der GSH-abhängige Metabolismus des Formaldehyd, welches bei der N-De-methylierung von Drogen entsteht, kann als Grund für den GSSG-Ausstrom ausgeschlossen werden, da exogen zugeführtes Formaldehyd keinen Effekt zeigt. Außerdem führt auch Hexobarbital, das kein Formaldehyd bildet, zu einem GSSG-Ausstrom.

Der Vorschlag, daß die aminopyrinbedingte NADPH-Oxidation über eine Beeinflussung der Äquilibrierung der Glutathion-Reduktase zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von GSSG und deshalb zu einem GSSG-Ausstrom (32) führt, braucht weitere Indize. Zwar spricht die Senkung der GSSG-Freisetzung nach Zufuhr von Laktat und Pyruvat für eine solche Annahme, es bestehen aber in letzter Zeit Hinweise, daß sich die Glutathion-Reduktase in Hepatozyten nicht im Gleichgewicht befindet (59).

Da sich trotz einer starken Abnahme des $NADPH/NADP^+$ -Quotienten in

Gegenwart von Ammoniumchlorid (38,48) kein korrespondierender GSSG-Mehrausstrom zu finden war, müssen weitere Studien zeigen, ob eine selektive Oxidation des mitochondrialen NADPH der Grund ist, oder ob der obige Vorschlag unhaltbar ist. Auf alle Fälle müßte eine Korrelation zwischen einer Abnahme des zytosolischen NADPH und einer Zunahme des GSSG durch weitere Experimente unterstützt werden.

Da eine direkte H_2O_2 -Bildung unwahrscheinlich ist, und auch eine Änderung des NADPH-Redoxzustandes als Ursache des GSSG-Ausstroms nicht überzeugen kann, gewinnt die Möglichkeit der Lipidperoxidation durch Drogenoxidation an Bedeutung. Lipidperoxide können von beiden GSH-Peroxidasen reduziert werden, und ihr Abbau ist deshalb vom Selenstatus unabhängig. Das könnte erklären, daß der GSSG-Ausstrom nach Aminopyrinoxidation bei Selenmangel- und Kontrolltieren zu beobachten ist.

2. Geschwindigkeitslimitierung der CO_2 -Bildung durch die Formiatoxidation

Die Ergebnisse zeigen, daß Formaldehyd - entweder entstanden durch die N-Demethylierung von Arzneimitteln wie Aminopyrin und Äthylmorphin (Tabelle 3) oder exogen zugeführtes Formaldehyd - von der perfundierten Leber nicht vollständig zu CO_2 oxidiert wird. Aufgrund der niedrigen Formaldehydausscheidung bei Arzneimittel-Oxidation und der großen Kapazität, Formaldehyd zu Formiat zu oxidieren ($1,2 \mu\text{Mol} \times g^{-1} \times \text{min}^{-1}$), kommt diese Reaktion als limitierender Schritt in der CO_2 -Produktion jedoch nicht in Frage.

Ein Teil der C_1 -Einheiten verläßt die Leber dagegen in Form von Formiat, so daß die Umwandlung von Formiat zu CO_2 geschwindigkeitsbestimmend ist. Dafür spricht auch die Kinetik der CO_2 -Produktion aus Aminopyrin und Formaldehyd, die mit derjenigen aus Formiat bezüglich der v_{max} genau übereinstimmt (Abb. 6). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Krebs et al. (21) an isolierten Hepatozyten, führt die Zufuhr von L-Methionin in Konzentrationen von 0,1 mM zu einem deutlichen Anstieg der Formiatoxidation. In der perfundierten Leber ist die Stimulierung der $^{14}CO_2$ -Produktion mit ^{14}C -Formaldehyd

und ^{14}C -Formiat als Ausgangssubstanzen (Abb.5 und 6) 4-fach,dagegen 3-fach,wenn Formaldehyd durch die N-Demethylierung von Aminopyrin gebildet wurde(Abb.1).Die maximale Geschwindigkeit der Formiat-oxidation betrug in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen an isolierten Hepatozyten (21) etwa $0,4 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und ist damit etwas höher als jene,die mit ring-markiertem Histidin gefunden worden war (7,21,40).

Da sich trotz Methioningabe bei höheren Aminopyrinkonzentrationen (1 mM) ebenso wie bei Infusionen von Formaldehyd weiterhin noch Formiat anstaut (Abb.3),scheint die Formiatoxidation für die CO_2 -Bildung geschwindigkeitslimitierend zu bleiben.

Der Anstau von Formiat trotz"physiologischerer"Verhältnisse(Methionin im arteriellen Perfusat) findet seine Bestätigung darin, daß in intakten phenobarbitalbehandelten Ratten nach Injektion von Aminopyrin 1/3 der gesamten Produktion an C_1 -Einheiten als Formiat im Urin erscheint (2),so daß auch in vivo die Formiatoxidation der langsamste Schritt im Abbau von Aminopyrin zu CO_2 ist.

Die Versuche mit Ratten,welche eine Methioninmangel-Diät erhielten, zeigen die Bedeutung des Methioninstatus auch im intakten Tier.

Diese Ratten zeigen im Vergleich mit den Kontrolltieren eine Verminderung der CO_2 -Produktion,die durch vorherige Injektion von Methionin verhindert werden kann (Tabelle 2).Der Methioninstatus ist vor allem in der Anfangsphase nach Aminopyringabe von Ausschlag, in der Zeit also,in der die Konzentration des Substrates und damit die N-Demethylierungsgeschwindigkeit noch relativ hoch ist.Dabei zeigt die Plateau-Bildung der CO_2 -Produktionsgeschwindigkeit bei Methioninmangel das Erreichen der maximalen Umsatzgeschwindigkeit an. Bei methioninsubstituierten Tieren,sei es durch methioninreiche Diät oder Methionininjektion,ist die Geschwindigkeit der Formiatoxidation erhöht,so daß sie den anfangs anfallenden höheren Formiatmengen besser gerecht wird.Ist dann nach einer Stunde die von der N-Demethylierung stammende Formiatmenge niedriger,so reicht die Oxidationskapazität auch bei den Tieren mit Methioninmangel aus,und die Kurven verlaufen unabhängig vom Methioninstatus fast deckungsgleich.

Das mag auch erklären,warum bei Tieren,die nicht mit Phenobarbital

vorbehandelt wurden, kein Methionineffekt zu beobachten war. Ihre N-Demethylierungsgeschwindigkeit und damit die Menge entstandenen Formiats ist so niedrig, daß die maximale Geschwindigkeit der Formiatoxidation (bei Methioninmangel) gar nicht erreicht wird, und eine Erhöhung der Geschwindigkeit keine Konsequenzen hat. Die oben beschriebene Plateau-Geschwindigkeit wird selbst nach Methioninjektion nicht überschritten (Abb.2).

Im übrigen stimmt die Geschwindigkeit der CO_2 -Abatmung in den methioninsubstituierten Tieren mit den Ergebnissen anderer Autoren (26,50) sehr gut überein.

Auch bei der Leberperfusion nimmt die Bedeutung des Methionineffekts relativ ab, wenn die Menge produzierten Formiats kleiner wird. Bei der Leber von Ratten, die nicht mit Phenobarbital vorbehandelt waren, ist nur eine 2-fache Stimulierung der CO_2 -Bildung aus Aminopyrin möglich, während sie bei den vorbehandelten Tieren 3-fach ist (Abb.1). Infundiert man die Leber mit nur 0,4 mM Aminopyrin, so ergibt sich nur eine 1,4-fache Steigerung der CO_2 -Produktion (Abb.9). Bei dieser niedrigen Konzentration staut sich nur noch verhältnismäßig wenig Formiat an - die Kapazität reicht aus, um fast alles sofort zu oxidieren - so daß nach Methioninstimulierung keine große Steigerung mehr möglich ist. Jetzt wird die N-Demethylierung limitierend.

Als Erklärung für die Beschleunigung der Formiatoxidation durch Methionin kann die sog. "methylfolate trap"-Theorie herangezogen werden, die schon 1962 von Noronha & Silverman (30) und Herbert & Zaluski (15) vorgeschlagen wurde und inzwischen allgemein anerkannt ist. Im Normalfall hemmt das aus Methionin entstehende S-Adenosylmethionin die Methylen-Reduktase (Schema 3), so daß nur 3 % der Folsäure als Methyltetrahydrofolat vorliegen, dagegen 23 % als 10-Formyltetrahydrofolat und 50 % als freies Tetrahydrofolat (7,40). So steht genug freies Tetrahydrofolat zur Verfügung, um mit Formiat zu 10-Formyltetrahydrofolat zu reagieren. Tritt nun ein Methioninmangel auf, sei es durch Auswaschen des Methionins während der Perfusion oder durch diätetische Maßnahmen, so sinkt die S-Adenosylmethionin-Konzentration (4) und deinhibiert die Methylen-Reduktase. Nun wird vermehrt Methyl-

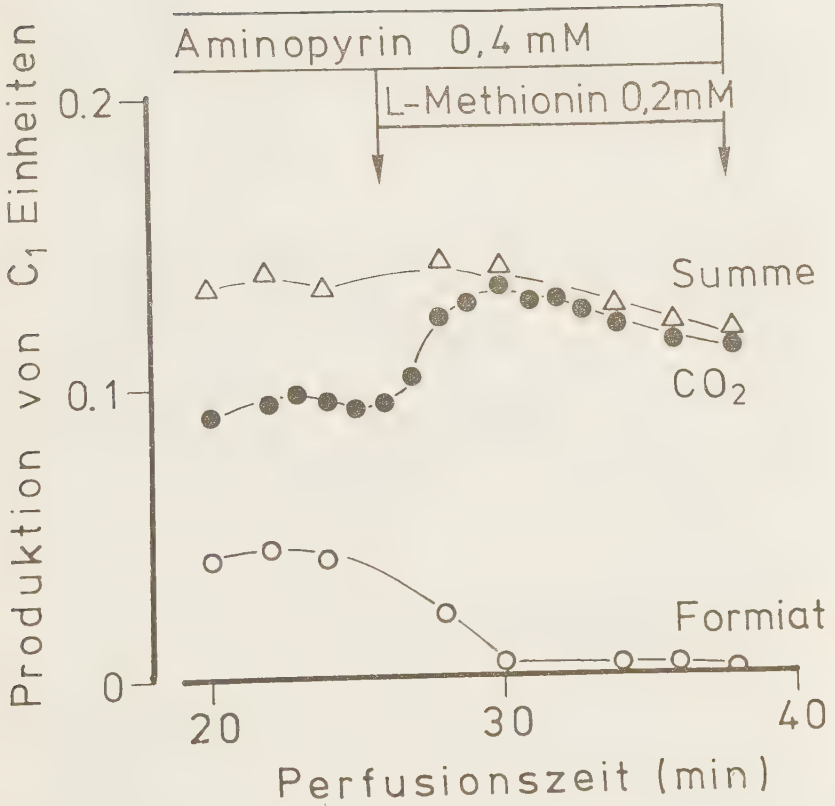


Abb.9

Produktion von C₁-Einheiten aus (Dimethylamino-¹⁴C)Aminopyrin (0,4 mM) in der perfundierten Leber phenobarbitalbehandelter Ratten

tetrahydrofolat gebildet, welches sich anstaut, da es wegen der Irreversibilität (20) der Bildungsreaktion nur noch über die relativ langsame Methionin-Synthetase abgebaut werden kann. Dadurch kommt es zu einer Umverteilung der verschiedenen Formen der Folsäure, so daß jetzt 70 % als Methyltetrahydrofolat vorliegen und nur noch 7 % als 10-Formyltetrahydrofolat und 10 % als freie Tetrahydrofolsäure (7,40). Bei einem Folsäuregehalt von $20 \mu\text{g} \times (\text{g Leber})^{-1}$ (3) ist die Folsäurekonzentration in der Leber etwa $60 \mu\text{M}$, wenn man annimmt, daß 1 g Leber 0,73 ml Wasser entsprechen. Mit und ohne Methionin liegen die Konzentrationen von 10-Formyltetrahydrofolat also bei $14 \mu\text{M}$ bzw. $4 \mu\text{M}$. Da die K_m der Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase für 10-Formyltetrahydrofolat bei $8,2 \mu\text{M}$ liegt (22), ist verständlich, daß Methionin die CO_2 -Produktion beschleunigt. Außerdem kann bei dem niedrigen Spiegel an freiem Tetrahydrofolat im Methioninmangel nicht genügend Formiat zu 10-Formyltetrahydrofolat aktiviert werden.

3. Relative Bedeutung der Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase und der peroxidatischen Reaktion der Katalase

Da die Zufuhr von Methionin in Konzentrationen die dem Plasmaspiegel entsprechen eine vielfache Stimulation der Formiatoxidation hervorruft, die Zufuhr von Glykolat als H_2O_2 -erzeugendes Substrat jedoch nur zu einem Zuwachs von 10-15 % mit Aminopyrin als Ausgangssubstanz führt, scheint es, daß der über 10-Formyltetrahydrofolat verlaufende Stoffwechselweg der dominierende ist. Das peroxisomale System arbeitet wegen der Begrenzung durch die H_2O_2 -Bildung mit niedriger Geschwindigkeit. Außerdem sind Formaldehyd und Formiat bezüglich der Katalase sogar Kompetitoren (Schema 1: Reaktionen 1c und 2c). Weiterhin hat in Versuchen mit der intakten Ratte (2) zugeführtes Methanol in Konzentrationen bis zu 100 mM die CO_2 -Produktion aus markiertem Aminopyrin nicht vermindert, wogegen bei Gabe von nicht markiertem Formiat aufgrund eines Isotopen-Verdünnungseffekts eine Abnahme beobachtet wurde.

Es mag in Anbetracht der hohen Geschwindigkeit des 10-Formyltetra-

hydrofolat-Wegs fraglich scheinen, ob durch Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus ^{14}C -Formiat die Produktion von H_2O_2 genau genug geschätzt werden kann, wie es in der Vergangenheit gemacht wurde (1,37).

4. Formaldehydoxidation

Sowohl die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase als auch die zytosolische Formaldehyd-Dehydrogenase sind an NAD^+ gekoppelt, und Änderungen des NADH-Redoxpotentials können die Oxidationsgeschwindigkeit beeinflussen. Da das mitochondriale NADH-Redoxpotential um 60 mV negativer als das zytosolische ist (41), kann eine Redoxpotential-Änderung besonders das mitochondriale Enzym treffen. Schenkman und Mitarbeiter (11,12) haben in der Tat eine apparente Hemmung der Formaldehydoxidation durch Succinat in Mischungen von Mikrosomen und Mitochondrien gefunden. Daß das mitochondriale NADH-Redoxpotential einen Einfluß auf die Formaldehydoxidation hat, zeigt indirekt Abb. 8, in der 3-Hydroxybutyrat die Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ vermindert, wogegen in Kontrollversuchen mit Formiat (nicht gezeigt) kein signifikanter Effekt auftrat. Da jedoch die Formiatoxidation in der CO_2 -Produktion aus Formaldehyd geschwindigkeitsbestimmend ist, sollte eine gleichzeitige Formiatbestimmung das wahre Ausmaß der Inhibition zeigen.

Da sich in Experimenten mit zytosolischen NAD^+ -Reduktanten wie Laktat, Xylit oder Äthanol ähnliche Ergebnisse zeigten, spielt auch die zytosolische Formaldehyd-Dehydrogenase eine Rolle. Orrenius (18) fand, nachdem er die Leberzellen mit Diäthylmaleat an Glutathion verarmt hatte, eine Abnahme der Formiatproduktion aus Aminopyrin. Auch dies spricht für eine Beteiligung der zytosolischen GSH-abhängigen Formaldehyd-Dehydrogenase.

Bei der Formaldehydoxidation sind also beide Enzyme beteiligt, welches jedoch überwiegt wäre noch zu zeigen.

5. Aminopyrinabbau und Schilddrüsenhormone

Wir haben in unseren Experimenten den Einfluß des Status des Schilddrüsenhormons auf die Umwandlung von Aminopyrin zu CO_2 in Methioninmangel-Ratten untersucht. Dabei führt die Hyperthyreose nur zu einem unwesentlichen Abfall der CO_2 -Produktion. Bei den mit Thiouracil gefütterten Tieren zeigt sich dagegen ein 15-20 %iger Anstieg der CO_2 -Abatmung, so daß durch die Hypothyreose der Methioninmangel zum Teil kompensiert werden konnte. In ähnlichen Experimenten mit Histidin waren die Unterschiede viel ausgeprägter (60). In den Kontrolltieren wurden ohne und mit Methionin 2,9 % bzw. 18,7 % des Histidins als CO_2 abgeatmet. In den thyroidektomierten Ratten waren die entsprechenden Werte 30,4 % bzw. 41,3 %.

Die Thyroidektomie führt zu einer Verminderung der Aktivität der Methylentetrahydrofolat-Reduktase und zu einer Verkleinerung des Anteils des Methyltetrahydrofolats am Gesamtfolat (51). Zusätzlich wurde gezeigt, daß die Behandlung mit Thiouracil die Aktivität der Methionin-Synthetase um den Faktor 2,3 steigert (52). Beide Veränderungen wirken also im Sinne einer Verminderung der Konzentration von Methyltetrahydrofolat und einer Vergrößerung der Anteile von 10-Formyltetrahydrofolat und freiem Tetrahydrofolat.

6. Konsequenzen für den " CO_2 -Abatmungstest" in Tier und Mensch

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, kann die Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung aus markierten Substanzen nicht uneingeschränkt zur Beurteilung der Abbauaktivität verwendet werden. Zum einen müssen mögliche Veränderungen im Methioninstatus berücksichtigt werden wie z.B. eine Erniedrigung des Methionins durch Fehl- oder Mangelernährung, Methionin-Malabsorption oder genetisch bedingte Enzymdefekte und eine Erhöhung des Methionins bei Leberinsuffizienz. Zum anderen sind auch endokrine Faktoren zu beachten. Denn neben dem Schilddrüsenhormon haben noch viele andere Hormone u.a. Hydrokortison, Testosteron, Östradiol, Glukagon induzierende oder hemmende Effekte

auf die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (13), welche die Umwandlung von Formiat zu CO_2 beeinflussen mögen.

Umgekehrt sind vielleicht auch Arzneimittel, die zu CO_2 abgebaut werden in der Lage, den Hormonstoffwechsel, die Proteinbiosynthese und andere an den Folsäure-Stoffwechsel gekoppelte Vorgänge zu verändern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der Leber von phenobarbitalvorbehandelten Ratten wurde bei Perfusion von Substanzen wie Aminopyrin, Äthylmorphin und Hexobarbital, welche am Cytochrom P-450 oxidiert werden, eine erhöhte Freisetzung von oxidiertem Glutathion (GSSG) beobachtet. Der aminopyrinabhängige GSSG-Ausstrom war auch in der Leber von Tieren mit Selenmangel zu finden, wogegen der H_2O_2 - und benzylammoniumchloridabhängige GSSG-Efflux aufgehoben war. Diese Ergebnisse sprechen für Änderungen im Lipidperoxid-Stoffwechsel und gegen eine direkte H_2O_2 -Produktion während der Drogenoxidation.
Eine Oxidierung des NADPH mit Ammoniumchlorid änderte den GSSG-Ausstrom nicht.
2. In der perfundierten Leber betrug die Produktion von Formaldehyd 0,02, von Formiat 0,24 und von CO_2 0,1 $\mu\text{Mol} \times (\text{g Leber-Feuchtgewicht})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (aus 1 mM Aminopyrin), wogegen die entsprechenden Werte nach Zugabe von 0,2 mM Methionin 0,02, 0,08 und 0,27 $\mu\text{Mol} \times (\text{g Leber-Feuchtgewicht})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ waren. Eine ähnlich große Stimulierung der CO_2 -Produktion durch Methionin war auch mit Formaldehyd und Formiat zu beobachten.
3. In Tieren mit einer methioninarmen Diät war die CO_2 -Abatmung gegenüber den Kontrolltieren um 25 % erniedrigt. Eine Methioninjektion kurz vor Versuchsbeginn führte zu einer Steigerung um 60 %. Diese Unterschiede sind auf Differenzen der CO_2 -Produktion in der 1. Stunde nach Beginn des Experiments zurückzuführen. In Ratten, die nicht mit Phenobarbital vorbehandelt waren, fand sich kein Methionineffekt.
4. Die Geschwindigkeit der Formaldehydoxidation ist mit 1,2 $\mu\text{Mol} \times (\text{g Leber-Feuchtgewicht})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ deutlich höher als die N-Demethylierungsgeschwindigkeit, so daß die Kapazität der Formaldehydoxidation ausreichend ist, um die N-Demethylierungsprodukte ohne Verzögerung abzubauen.

5. Der Anteil der peroxidatischen Reaktion der Katalase in der Formiat- und CO_2 -Bildung ist aufgrund einer begrenzten H_2O_2 -Produktion niedrig. Wenn ein H_2O_2 -bildendes Substrat wie Glykolat zugegeben wird, so steigt die CO_2 -Produktion aus Aminopyrin und Formaldehyd.
6. Der Anstau von Formiat selbst nach Gabe von Methionin zeigt, daß die Formiatoxidation im Abbau von Aminopyrin zu CO_2 der langsamste Schritt ist.
7. Ein Anstieg in den mitochondrialen und zytosolischen NADH-Redox-indikator-Quotienten 3-Hydroxybutyrat/Acetoacetat und Laktat/Pyruvat führte zu einer Verminderung der CO_2 -Produktion aus Aminopyrin und Formaldehyd (jedoch kaum aus Formiat). Den gleichen Effekt zeigten die zytosolischen NAD^+ -Reduktanten Xylit und Äthanol.
8. Der hypothyreote Zustand nach Gabe von Thiouracil hat einen ähnlichen Effekt auf die CO_2 -Atemung wie Methionin. Die CO_2 -Produktion wurde um 20 % erhöht.

VI.REFERENZEN

1. Aebi,H.,Frei,E.,Knab,R. & Siegenthaler,P. (1957) *Helv. Physiol. Acta*, 15,150 - 167.
2. Aebi,H., & Roggen,G. (1958) *Pharm. Acta Helv.* 33,413 -428.
3. Bird,O.D., McGlohon,V.M. & Vaitkus,J.W. (1965) *Anal. Biochem.* 12,18.
4. Bloomer,J.H. & Stokstad,E.L.R. (1978)
vorgetragen am Am. Inst. of Nutrition,Atlantic City.
5. Brodie,B.B. & Axelrod,J. (1950) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 99,171-184.
6. Brodie,B.B., Gillette,J.R. & LaDu,B.N. (1958) *Ann. Rev. Biochem.* 27,427.
7. Bühring,K.U., Batra,K.K. & Stokstad,E.L.R. (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, 279,498 - 512.
8. Burk,R.F. & Masters,B.S.S. (1975) *Arch.Biochem.Biophys.* 170, 124-131.
9. Burk,R.F., Nishiki,K., Lawrence,R.A. & Chance,B. (1978) *J.Biol.Chem.* 251,43-46.
10. Chance,B. (1950) *J.Biol.Chem.* 182,649-658.
11. Cinti,D.L., Keyes,S.R., Lemelin,M.A., Denk,H. & Schenkman,J.B. (1976) *J.Biol.Chem.* 251,1571-1577.
12. Denk,H., Moldeus,P.W., Schulz,R.A., Schenkman,J.B., Keyes,S.R. & Cinti,D.L. (1976) *J.Cell.Biol.* 69,589-598.
13. Finkelstein,J.D.,Martin,J.J., Kyle,W.E. & Harris,B.J. (1978) *Arch.Biochem.Biophys.* 191,153-160.
14. Häussinger,D., Weiss,L. & Sies,H. (1975) *Eur.J.Biochem.* 52, 421-431.
15. Herbert,V. & Zalusky,R. (1962) *J.Clin.Invest.* 41,1263-1276

16. Höpner, T. & Knappe, J. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg. Bergmeyer, H.U.) 3. Aufl. 1596-1600, Verlag Chemie, Weinheim.
17. Jeffay, H. & Alvarez, J. (1961) Anal. Chem. 33, 612-615.
18. Jones, D.P., Thor, H., Andersson, B. & Orrenius, S. (1978) J. Biol. Chem. 252, 6031-6037.
19. Junge, O. & Brand, K. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 171, 398-406.
20. Katzen, H.M. & Buchanan, J.M. (1965) J. Biol. Chem. 240, 825-835.
21. Krebs, H.A., Hems, R. & Tyler, B. (1976) Biochem. J. 158, 341-353
22. Kutzbach, C.A. & Stokstad, E.L.R. (1967) Biochem. Biophys. Acta 139, 217.
23. Kutzbach, C.A. & Stokstad, E.L.R. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 111-117.
24. Kutzbach, C.A. & Stokstad, E.L.R. (1971) Methods in Enzymology 18, 793-799.
25. LaDu, B.N., Gaudette, L., Trousof, N. & Brodie, B.B. (1955) J. Biol. Chem. 214, 741-752.
26. Lauterburg, B.H. & Bircher, J. (1976) J. Pharm. Exp. Ther. 196, 501-509.
27. Lawrence, R.A. & Burk, R.F. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 952-958.
28. Makar, A.B. & Tephly, T.R. (1977) J. Tox. Envir. Health 2, 1201-1209.
29. Nash, I. (1953) Biochem. J. 55, 416-421.
30. Noronha, J.M. & Silverman, M. (1962) in Eur. Symp. Vitamin B₁₂ Intrinsic Factor (Hrsg. Heinrich, H.C.) 2. Aufl., 728-736, F. Enke, Stuttgart.
31. Orrenius, S., Ericsson, J.L.E. & Ernster, L. (1965) J. Cell. Biol. 25, 627-639.

32. Oshino, N. & Chance, B. (1977) *Biochem.J.* 162, 509-525.
33. Oshino, N., Chance, B., Sies, H. & Bücher, T. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 117-131.
34. Oshino, N., Oshino, R. & Chance, B. (1973) *Biochem.J.* 131, 555-563
35. Owens, C.W. & Belcher, R.V. (1965) *Biochem.J.* 94, 705-711.
36. Palese, M. & Tephly, T.R. (1975) *J. Tox. Envir. Health*, 1, 13-24.
37. Portwich, F. & Aebi, H. (1960) *Helv. Physiol. Acta*, 18, 312-327.
38. Racker, E. (1951) *J. Biol. Chem.* 190, 685-696.
39. Sawicki, E. & Sawicki, C.R. (1978) in *Aldehyds - Photometric Analysis*, 144, Academic Press, London-New York-San Francisco.
40. Shin, Y.S., Bühring, K.U. & Stokstad, E.L.R. (1975) *Mol. Cell. Biochem.* 9, 97-108.
41. Sies, H. (1974) in *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems* (Hrsg. Thurman, R.G., Yomtani, T., Williamson, J.R. & Chance, B.) 183-197, Academic Press, New York.
42. Sies, H., Akerboom, T.P.M. & Tager, J.M. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72, 301-307.
43. Sies, H., Bartoli, G.M., Burk, R.F. & Waydhas, C. (1978) *Eur. J. Biochem.* 89, 113-118
44. Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. & Flohé, L. (1972) *FEBS Lett.* 27, 171-175.
45. Sies, H., Häussinger, D. & Grosskopf, M. (1974) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 355, 305-318.
46. Sies, H. & Moss, K.M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 377-383.
47. Sies, H. & Summer, K.H. (1975) *Eur. J. Biochem.* 57, 503-512.
48. Sies, H., Summer, K.H. & Bücher, T. (1975) *FEBS Lett.* 54, 274-278.
49. Sies, H., Weigl, K. & Waydhas, C. (1978) in *The Induction of Drug Metabolism* (Hrsg. Estabrook, R.W. & Lindenlaub, E.) 383-400 F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

50. Stewart,D.J., Inaba,T. & Kalow,W. (1978) J.Pharm.Exp.Ther. 207,171-177.
51. Stokstad,E.L.R., Chan,M.M.S. & Bloomer,J.E. (1979) in Chemistry and Biology of Pteridines (Hrsg. Kisliuk & Brown) 603-608 Elsevier North Holland,Inc.
52. Stokstad,E.L.R. & Jaenicke,L. (1979) in Intrinsic Factor B₁₂ Symposium,Zürich
53. Stokstad,E.L.R., Webb,R.S. & Shah,E. (1966) Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 123,752-754.
54. Strittmatter,P. & Ball,E.G. (1955) J.Biol.Chem. 213,445-461.
55. Tephly,T.R., Watkins,W.D. & Goodman,J.I. (1974) Essays Toxicol. 5,149-177.
56. Tietze,F. (1969) Anal.Biochem. 27,502-522.
57. Tischler,M.E., Friedrichs,D., Coll,K. & Williamson,J.R. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 184,222-236.
58. Uotila,L. & Koivusalo,M. (1974) J.Biol.Chem. 249,7653-7663
59. Vina,J., Hems,R. & Krebs,H.A. (1978) Biochem.J. 170,627-630.
60. Waydhas,C., Sies,H. & Stokstad,E.L.R. (1979) FEBS Lett. in Druck
61. Waydhas,C., Weigl,K. & Sies,H. (1978) Eur.J.Biochem. 89,143-150.
62. Weigl,K. & Sies,H. (1977) Eur.J.Biochem. 77,401-408.
63. Williams,M.A., Chu,L.C.,McIntosh,D.J. & Hincenbergs,I. (1968) J.Nutr. 94,377.
64. Wu,S.Y. & Smuckler,E.A. (1969) in Microsomes and Drug Oxidation (Hrsg. Gillette,J.R., Conney,A.H., Cosmides,G.J., Estabrook,R.W., Fouts,J.R. & Mannering,G.J.) 189-197, Academic Press.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten: Christian Waydhas, geboren am 27.10.1956 in München als Sohn des Architekten Dipl.Ing. Fritz Waydhas und seiner Ehefrau Margrit, geb. Ernst

Schul Ausbildung: 1963-1967 Volksschule in München
1967-1975 Erasmus Grasser-Gymnasium in München
Mai 1975 Abitur

Berufsausbildung: 1975 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig Maximilians-Universität in München
1977 Ärztliche Vorprüfung
1977-1979 Experimentelle Arbeit für die Promotionsarbeit am Inst. f. Physiologische Chemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. med. H. Sies
1978 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
1981 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
1982 3. Teil der Ärztlichen Prüfung
28. Mai 1982 Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang: seit August 1982 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr als Stabsarzt

